

2/4/1

DIALOG(R)File 351:DERWENT WPI

(c) 2000 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

AA- 96-287897/199630 |

XR- <XRAM> C96-092122|

XR- <XRPX> N96-241650|

TI- **Affinity viscometry hydrocolloid, e.g. for glucose determ. -  
comprising dispersion of co-lyophilisate obtd. from ligand-contg.  
polysaccharide and receptor molecule, giving high sensitivity.**

PA- BALLERSTAEDT R (BALL-I); EHWALD R (EHWA-I)|

AU- <INVENTORS> BALLERSTAEDT R; EHWALD R|

NC- 001|

NP- 001|

PN- DE 4446695 A1 19960620 **DE 4446695** A 19941213 G01N-037/00 199630 B  
|

AN- <LOCAL> DE 4446695 A 19941213|

AN- <PR> DE 4446695 A 19941213|

LA- DE 4446695(4)|

AB- <BASIC> DE 4446695 A

**A novel hydrocolloid (I) for affinity viscometry comprises  
dispersible colloidal particles of a co-lyophilisate of water soluble  
neutral polysaccharide molecules (II) contg. several affinity ligands  
and polyvalent receptors (III) for the affinity ligands.**

**(II) pref. comprise dispersible polysaccharide particles obtd. by  
covalently crosslinking several polysaccharide molecules, esp. dextran  
molecules crosslinked with divinyl sulphone or epichloro-hydrin.**

**USE - (I) is useful in the continuous determ. of the concn. of low  
mol.wt. affinity ligands (e.g. glucose) or in the determ. of affinity  
receptor concns. (I) may be incorporated into hollow fibres or dialysis  
chambers (claimed) for standardised prodn. of affinity sensors (see  
DE4203466).**

**ADVANTAGE - (I) are 'standardised' hydrocolloids with high receptor  
concn., which provide highly sensitive and reproducible viscosity  
values in the determ. of affinity ligands.**

Dwg.0/0|

DE- <TITLE TERMS> AFFINITY; HYDROCOLLOID; GLUCOSE; DETERMINE; COMPRISE;  
DISPERSE; CO; LYOPHILISE; OBTAIN; LIGAND; CONTAIN; POLYSACCHARIDE;  
RECEPTOR; MOLECULAR; HIGH; SENSITIVE|

DC- A96; B04; S03|

IC- <MAIN> G01N-037/00|

IC- <ADDITIONAL> B01D-015/08; B01J-020/22; C08B-037/02; C08L-005/02;  
G01N-015/00; G01N-033/44; G01N-033/68|

MC- <CPI> A03-A00A; A12-V03C2; B04-B01B; B04-C02C; B04-C03B; B04-G01;  
B05-B01P; B10-A07; B11-C08E; B12-K04A|

MC- <EPI> S03-E14D7; S03-E14H; S03-F05|

FS- CPI; EPI||



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 44 46 695 A 1**

⑳ Aktenzeichen: P 44 46 695.1  
㉑ Anmeldetag: 13. 12. 94  
㉒ Offenlegungstag: 20. 6. 96

㉓ Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**G 01 N 37/00**  
G 01 N 15/00  
G 01 N 33/44  
G 01 N 33/68  
B 01 D 15/08  
B 01 J 20/22  
C 08 B 37/02  
C 08 L 5/02  
// C07C 317/04, C08J  
3/24, C08K 5/41, 5/15

DE 44 46 695 A 1

㉔ Anmelder:  
Ehwald, Rudolph, Prof. Dr., 10115 Berlin, DE;  
Ballerstädt, Ralph, Dipl.-Biol., 10437 Berlin, DE

㉕ Erfinder:  
gleich Anmelder

㉖ Hydrocolloid für die Affinitätsviskometrie

㉗ Die Erfindung betrifft ein Hydrocolloid für die Affinitätsviskometrie. Das erfindungsgemäße Hydrocolloid ist das Co-Lyophilisat aus einem polyvalenten Affinitäts-Rezeptormolekül, z. B. einem Lektin oder Antikörper, und einem Affinitätsliganden tragenden wasserlöslichen neutralen Polysaccharid. Der Vorteil der Erfindung liegt in einer hohen Empfindlichkeit und verbesserten Reproduzierbarkeit von Viskositätsmessungen zur Bestimmung von Affinitätsliganden. Eine weitere Empfindlichkeitssteigerung läßt sich dadurch erreichen, daß ein Polysaccharid verwendet wird, dessen Moleküle zu größeren löslichen Molekülaggregaten kovalent vernetzt sind.

DE 44 46 695 A 1

## Beschreibung

Bei der Affinitätsviskometrie wird die Viskosität einer wäßrigen Polymerdispersion aus Hydrocolloiden, die außer einem wasserlöslichen polymeren Stoff mit funktionellen Gruppen für die Affinitätsbindung (Affinitätsli-  
 5 ganden) einen geeigneten polymeren Rezeptor für die Affinitätsliganden enthält, als Maß für die Konzentration der Affinitätsbindungen gemessen. Die Affinitätsviskometrie ist für die kontinuierliche Konzentrationsmessung von niedermolekularen Affinitätsliganden, die kompetitiv die Konzentration der Affinitätsbindung zwischen den Polymeren beeinflussen, geeignet (Ehwald und Ballerstädt, DE 42 03 466 A1, Ballerstädt und Ehwald, Bio-  
 10 sensors & Bioelectronics 9/1994, 557—567), kann aber grundsätzlich auch zur Messung der Konzentration von Affinitätsrezeptoren eingesetzt werden. Hohe Konzentrationen und hohe Molekulargewichte des ligandentragenden polymeren Stoffes sind erforderlich, um eine gut erfaßbare Viskositätsänderung zu induzieren. Die erreichbare Konzentration der Rezeptoren auf Proteinbasis ist durch ihre Löslichkeit in Wasser begrenzt. Durch Zuführung von Con A zu einer gerührten Dextranlösung lassen sich homogene Affinitätsdispersionen mit einer Lektinkonzentration von < 2% (Gewicht/Volumen) herstellen. Daher kann die exponentielle Zunahme der  
 15 glucoseempfindlichen Extraviskosität des Affinitätssols mit der Lektinkonzentration nur in einem begrenzten Konzentrationsbereich erfaßt werden. Die Reproduzierbarkeit der Messungen wird dadurch erschwert, daß geringe Veränderungen in der Aktivität und Konzentration des Rezeptors sich sehr stark auf den Viskositätswert und die Konzentrationsabhängigkeit auswirken, und es beim Mischen der polymeren Komponenten zur Präzipitation kommen kann. Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Bereitstellung standardisierter Hydrocol-  
 20 loide mit hoher Rezeptorkonzentration und Empfindlichkeit.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß die dispergierbaren Teilchen des Hydrocolloids das Co-Lyophilisat aus wasserlöslichen, mehrere Affinitätsliganden tragenden neutralen Polysaccharidmolekülen und passenden poly-  
 valenten Rezeptoren bilden.

Unerwartet hat sich gezeigt, daß durch Auflösung eines Co-Lyophilisats der ursprünglichen Dispersion aus  
 25 dem polyvalenten Rezeptor Concanavalin A (Con A) und dem ligandentragenden Polymer Dextran eine Viskositätsdispersion mit wesentlich höherer Rezeptorkonzentration und Empfindlichkeit für den niedermolekularen spezifischen Analyten, in diesem Falle Glucose, hergestellt werden kann als es durch Auflösen der einzelnen Komponenten möglich ist. Unerwartet zeigte sich dabei weiterhin, daß die mit dem Gefrieren bzw. der Gefrier-  
 30 trocknung verbundene Inaktivierung des Lektins und die hiermit verbundene Entstehung eines unlöslichen Anteils nicht auftritt, wenn die polymeren Komponenten nicht einzeln lyophilisiert werden sondern ein Co-Lyophilisat aus Dextran und Con A hergestellt wird. Die Co-Lyophilisate sind besonders vorteilhafte Hydrocolloide für die Affinitätsviskometrie, weil sie die Komponenten in einem definierten Mengenverhältnis enthalten und so die reproduzierbare Herstellung von Affinitätsdispersionen vereinfachen. Wegen der höheren möglichen  
 35 Konzentration an Rezeptoren und der exponentiellen Abhängigkeit der Empfindlichkeit von der Rezeptorkonzentration ermöglichen die erfindungsgemäßen Hydrocolloide eine beträchtliche Empfindlichkeitssteigerung. Die Erfindung ist nicht allein auf die im Beispiel dargestellte Kombination eines Lektins mit Dextran beschränkt, da die Co-Lyophilisation anderer Protein-Rezeptoren mit ligandentragenden neutralen Polysaccharidmolekülen ebenfalls möglich ist.

Das erfindungsgemäße Hydrocolloid kann auch in der Hohlfaser oder Dialysekammer gebildet werden,  
 40 wodurch die standardisierte Herstellung der Affinitätssensoren (vergl. DE 42 03 466 A1) erleichtert wird.

Eine ganz wesentliche Empfindlichkeitssteigerung ist dadurch möglich, daß anstelle eines einfachen liganden-  
 tragenden Polysaccharids ein modifiziertes ligandentragendes Polysaccharid verwendet wird, das durch kova-  
 lente Vernetzung mehrerer Polysaccharidmoleküle entsteht.

## Ausführungsbeispiel

## 1. Glukoseabhängige Viskosität eines Co-Lyophilisats aus Concanavalin A und Dextran T2000

Eine 2%ige Dextran T2000-Lösung wurde mit einer 2%igen Lösung von Con A vermischt und anschließend  
 50 lyophilisiert. Die Löslichkeit des Lektins im Komplex mit dem Dextran war weit besser als die Löslichkeit des reinen Proteins. Es konnten homogene Dispersionen mit über 3% Con A hergestellt werden. Die glucoseempfindliche Dispersionsviskosität betrug bei einer Lektinkonzentration von 3% im wiederaufgelösten Co-Lyophilisat das etwa 20fache der Viskosität einer Vergleichsdispersion mit 1% Con A und gleicher Dextran  
 55 T2000-Konzentration (Tab. 1). Wenn man das erfindungsgemäße Hydrocolloid in eine Hohlfaser einsaugt und diese in flüssigem Stickstoff einfriert und anschließend gefriertrocknet, erhält man eine Hohlfaser, die für die Herstellung von Affinitätssensoren vorteilhaft verwendet werden kann. Alle Kleb- und Dichtungsarbeiten mit dieser Hohlfaser können im trockenen Zustand durchgeführt werden. Die glucoseempfindliche Polymerdispersion bildet sich beim Einquellen der Sensorfaser in Wasser unter Vakuum in kurzer Zeit.

## 60 2. Lektin- und zuckerabhängige Viskosität eines Hydrocolloids mit dispergierbaren Teilchen, die aus kovalent vernetzten Dextranmolekülen bestehen

Eine gerührte konzentrierte Dextran T2000-Lösung (5% w w<sup>-1</sup>) wurde bei pH 11—12 und bei Raumtempera-  
 65 tur mit kleinen Mengen Divinylsulfon (0,5%) versetzt, dabei wurde die Zunahme der Viskosität verfolgt. Nach Erhöhung der Viskosität auf das Zwanzigfache (ca. 2 h) wurde die Reaktionslösung mit einer 10%igen Glycin-Lösung vermischt und nach weiteren 2 h neutralisiert. Anschließend wurde das in dieser Weise präparierte Polysaccharid gegen destilliertes Wasser dialysiert und gefriertrocknet. Die Wirkung des Lektins Con A (Konz. 0,2%) auf die Viskosität der aus dem Lyophilisat wiederaufgelösten Dispersion aus modifiziertem

## Beschreibung

Bei der Affinitätsviskosimetrie wird die Viskosität einer wäßrigen Polymerdispersion aus Hydrocolloiden, die außer einem wasserlöslichen polymeren Stoff mit funktionellen Gruppen für die Affinitätsbindung (Affinitätsli-  
 5 ganden) einen geeigneten polymeren Rezeptor für die Affinitätsliganden enthält, als Maß für die Konzentration der Affinitätsbindungen gemessen. Die Affinitätsviskosimetrie ist für die kontinuierliche Konzentrationsmessung von niedermolekularen Affinitätsliganden, die kompetitiv die Konzentration der Affinitätsbindung zwischen den Polymeren beeinflussen, geeignet (Ehwald und Ballerstädt, DE 42 03 466 A1, Ballerstädt und Ehwald, Bio-  
 10 sensors & Bioelectronics 9/1994, 557—567), kann aber grundsätzlich auch zur Messung der Konzentration von Affinitätsrezeptoren eingesetzt werden. Hohe Konzentrationen und hohe Molekulargewichte des ligandentragenden polymeren Stoffes sind erforderlich, um eine gut erfaßbare Viskositätsänderung zu induzieren. Die erreichbare Konzentration der Rezeptoren auf Proteinbasis ist durch ihre Löslichkeit in Wasser begrenzt. Durch Zuführung von Con A zu einer gerührten Dextranlösung lassen sich homogene Affinitätsdispersionen mit einer  
 15 Lektinkonzentration von < 2% (Gewicht/Volumen) herstellen. Daher kann die exponentielle Zunahme der glucoseempfindlichen Extraviskosität des Affinitätssols mit der Lektinkonzentration nur in einem begrenzten Konzentrationsbereich erfaßt werden. Die Reproduzierbarkeit der Messungen wird dadurch erschwert, daß geringe Veränderungen in der Aktivität und Konzentration des Rezeptors sich sehr stark auf den Viskositäts-  
 20 wert und die Konzentrationsabhängigkeit auswirken, und es beim Mischen der polymeren Komponenten zur Präzipitation kommen kann. Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Bereitstellung standardisierter Hydrocolloide mit hoher Rezeptorkonzentration und Empfindlichkeit.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß die dispergierbaren Teilchen des Hydrocolloids das Co-Lyophilisat aus wasserlöslichen, mehrere Affinitätsliganden tragenden neutralen Polysaccharidmolekülen und passenden poly-  
 valenten Rezeptoren bilden.

Unerwartet hat sich gezeigt, daß durch Auflösung eines Co-Lyophilisats der ursprünglichen Dispersion aus  
 25 dem polyvalenten Rezeptor Concanavalin A (Con A) und dem ligandentragenden Polymer Dextran eine Viskositätsdispersion mit wesentlich höherer Rezeptorkonzentration und Empfindlichkeit für den niedermolekularen spezifischen Analyten, in diesem Falle Glucose, hergestellt werden kann als es durch Auflösen der einzelnen Komponenten möglich ist. Unerwartet zeigte sich dabei weiterhin, daß die mit dem Gefrieren bzw. der Gefrier-  
 30 trocknung verbundene Inaktivierung des Lektins und die hiermit verbundene Entstehung eines unlöslichen Anteils nicht auftritt, wenn die polymeren Komponenten nicht einzeln lyophilisiert werden sondern ein Co-Lyophilisat aus Dextran und Con A hergestellt wird. Die Co-Lyophilisate sind besonders vorteilhafte Hydrocolloide für die Affinitätsviskosimetrie, weil sie die Komponenten in einem definierten Mengenverhältnis enthalten und so die reproduzierbare Herstellung von Affinitätsdispersionen vereinfachen. Wegen der höheren möglichen  
 35 Konzentration an Rezeptoren und der exponentiellen Abhängigkeit der Empfindlichkeit von der Rezeptorkonzentration ermöglichen die erfindungsgemäßen Hydrocolloide eine beträchtliche Empfindlichkeitssteigerung. Die Erfindung ist nicht allein auf die im Beispiel dargestellte Kombination eines Lektins mit Dextran beschränkt, da die Co-Lyophilisation anderer Protein-Rezeptoren mit ligandentragenden neutralen Polysaccharidmolekülen ebenfalls möglich ist.

Das erfindungsgemäße Hydrocolloid kann auch in der Hohl-faser oder Dialyse-kammer gebildet werden,  
 40 wodurch die standardisierte Herstellung der Affinitätssensoren (vergl. DE 42 03 466 A1) erleichtert wird.

Eine ganz wesentliche Empfindlichkeitssteigerung ist dadurch möglich, daß anstelle eines einfachen liganden-  
 tragenden Polysaccharids ein modifiziertes ligandentragendes Polysaccharid verwendet wird, das durch kova-  
 lente Vernetzung mehrerer Polysaccharidmoleküle entsteht.

## Ausführungsbeispiel

## 1. Glukoseabhängige Viskosität eines Co-Lyophilisats aus Concanavalin A und Dextran T2000

Eine 2%ige Dextran T2000-Lösung wurde mit einer 2%igen Lösung von Con A vermischt und anschließend  
 50 lyophilisiert. Die Löslichkeit des Lektins im Komplex mit dem Dextran war weit besser als die Löslichkeit des reinen Proteins. Es konnten homogene Dispersionen mit über 3% Con A hergestellt werden. Die glucoseempfindliche Dispersionsviskosität betrug bei einer Lektinkonzentration von 3% im wiederaufgelösten Co-Lyophilisat das etwa 20fache der Viskosität einer Vergleichsdispersion mit 1% Con A und gleicher Dextran  
 55 T2000-Konzentration (Tab. 1). Wenn man das erfindungsgemäße Hydrocolloid in eine Hohl-faser einsaugt und diese in flüssigem Stickstoff einfriert und anschließend gefriertrocknet, erhält man eine Hohl-faser, die für die Herstellung von Affinitätssensoren vorteilhaft verwendet werden kann. Alle Kleb- und Dichtungsarbeiten mit dieser Hohl-faser können im trockenen Zustand durchgeführt werden. Die glucoseempfindliche Polymerdispersion bildet sich beim Einquellen der Sensorfaser in Wasser unter Vakuum in kurzer Zeit.

## 2. Lektin- und zuckerabhängige Viskosität eines Hydrocolloids mit dispergierbaren Teilchen, die aus kovalent vernetzten Dextranmolekülen bestehen

Eine gerührte konzentrierte Dextran T2000-Lösung (5% w w<sup>-1</sup>) wurde bei pH 11—12 und bei Raumtempera-  
 60 tur mit kleinen Mengen Divinylsulfon (0,5%) versetzt, dabei wurde die Zunahme der Viskosität verfolgt. Nach Erhöhung der Viskosität auf das Zwanzigfache (ca. 2 h) wurde die Reaktionslösung mit einer 10%igen Glycin-Lösung vermischt und nach weiteren 2 h neutralisiert. Anschließend wurde das in dieser Weise präparierte, Polysaccharid gegen destilliertes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet. Die Wirkung des Lektins Con A (Konz. 0,2%) auf die Viskosität der aus dem Lyophilisat wiederaufgelösten Dispersion aus modifiziertem

Dextran war etwa 50fach höher als bei der Dispersion aus unvernetztem Dextran T2000 (Tab. 2). Entsprechende Ergebnisse werden auch erhalten, wenn die Vernetzung mit Epichlorhydrin vorgenommen wird. Bei der Reaktion der Dextranmoleküle mit Divinylsulfon, Epichlorhydrin u. a. Vernetzungsmitteln kann gleichzeitig, falls erforderlich, die Verknüpfung des Dextranmoleküls mit ursprünglich nicht vorhandenen Affinitätsliganden vorgenommen werden. Dies wurde am Beispiel galaktosehaltiger Disaccharide (Laktose, Raffinosae) realisiert. Dadurch, daß die Vernetzung in konzentrierten Lösungen dieser Zucker erfolgte, wurden terminale  $\beta$ -glykosidisch gebundene Galactose-Gruppen an die dispergierbaren vernetzten Dextranspartikeln gekoppelt. Die Viskosität des mit diesen Teilchen und dem galactosidspezifischen Lektin Ricinus communis-Agglutinin gebildeten Affinitätssols ist stark von der Galactosekonzentration abhängig.

## Tabellen

## Tabelle 1

Wirkung der Konzentration des Con A auf die Viskosität der wiederaufgelösten Dispersionen aus dem Co-Lyophilisat im Vergleich zu einer nicht-lyophilisierten Dispersion bei gleicher Dextran T2000-Konzentration (3%)

Art der wiederaufgelösten Dispersion,	Viskosität [mPa s]*	Glucoseabhängige Viskosität [mPa s]
Co-Lyophilisat 3 % Con A	6596,9	6593,1
Nicht lyophilisiert 1 % Con A	219,2	215,3

\* T=24°C, Mittelwerte (n=3)

## Tabelle 2

Wirkung von Con A auf die Viskosität von Dispersionen mit Dextranen unterschiedlicher Dispersität

Dispersion Typ, Konz.	Viskosität [mPa s]*		
	A ohne Con A	B mit 0.2 % Con A	B - A
Dextran T2000, 3 %	4,09	7,00	2,91
modifiziertes Dextran, 3 %	26,28	168,10	141,82

\* T=24°C, Mittelwerte (n=3)

## Patentansprüche

1. Hydrocolloid für die Affinitätsviskometrie, dadurch gekennzeichnet, daß die dispergierbaren kolloidalen Teilel das Co-Lyophilisat aus wasserlöslichen, mehrere Affinitätsliganden tragenden neutralen Polysaccharidmolekülen und polyvalenten Rezeptoren für die Affinitätsliganden bilden.

2. Hydrocolloid für die Affinitätsviskometrie nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich in einer Hohlfaser oder Dialysekammer befindet.

3. Hydrocolloid für die Affinitätsviskometrie, dadurch gekennzeichnet, daß es dispergierbare Polysaccharid-Teilchen, die durch kovalenten Vernetzung mehrerer Polysaccharidmoleküle gebildet werden, enthält.

4. Hydrocolloid für die Affinitätsviskometrie nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Polysaccharidmoleküle Dextranmoleküle sind und daß die dispergierbaren Teilchen durch Vernetzung der Dextranmoleküle mit Divinylsulfon oder Epichlorhydrin entstehen.

2. Hydrocolloid für die Affinitätsviskometrie nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich in einer Hohlfaser oder Dialysekammer befindet.

3. Hydrocolloid für die Affinitätsviskometrie, dadurch gekennzeichnet, daß es dispergierbare Polysaccharid-Teilchen, die durch kovalenten Vernetzung mehrerer Polysaccharidmoleküle gebildet werden, enthält.

5 4. Hydrocolloid für die Affinitätsviskometrie nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Polysaccharidmoleküle Dextranmoleküle sind und daß die dispergierbaren Teilchen durch Vernetzung der Dextranmoleküle mit Divinylsulfon oder Epichlorhydrin entstehen.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65